

Docket No. 210352US00X/bt

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

FEB 11 2002

TECH CENTER 1600/2900

IN RE APPLICATION OF: Ryuichiro KURANE, et al.

GAU: 1623

SERIAL NO: 09/891,517

EXAMINER:

FILED: June 27, 2001

FOR: NOVEL NUCLEIC ACID PROBES, METHOD FOR DETERMINING CONCENTRATIONS OF NUCLEIC ACID BY USING THE PROBES, AND METHOD FOR ANALYZING DATA OBTAINED BY THE METHOD

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number [US App No], filed [US App Dt], is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
JAPAN	2000-193133	June 27, 2000
JAPAN	2000-236115	August 3, 2000
JAPAN	2000-292483	September 26, 2000

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
(B) Application Serial No.(s)
- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

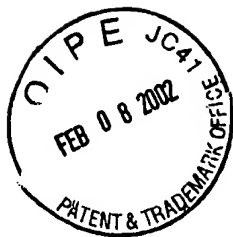
WILLIAM E. BEAUMONT OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
REGISTRATION NUMBER 30,996 MAIER & NEUSTADT, P.C.



22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 10/98)

Norman F. Oblon
Registration No. 24,618



日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

RECEIVED
FEB 11 2002
TECH CENTER 1600/2901

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2000年 6月27日

出 願 番 号
Application Number:

特願2000-193133

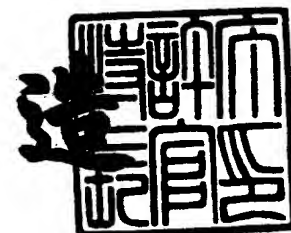
出 願 人
Applicant(s):

環境エンジニアリング株式会社
独立行政法人産業技術総合研究所

2001年10月12日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3055577

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010135

【納付金額】 14,280円

【その他】

国以外のすべての者の持分の割合 068/100
国等の委託研究の成果に係る特許出願（平成11年度
、新エネルギー・産業技術総合開発機構、複合生物系等
生物資源利用技術開発、産業活力再生特別措置法第30
条の適用を受けるもの）

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9717259

【包括委任状番号】 9812328

【プルーフの要否】 要

【書類名】	特許願
【整理番号】	EN000405
【提出日】	平成12年 6月27日
【あて先】	特許庁長官殿
【国際特許分類】	C12Q 01/00 C12Q 01/64
【発明の名称】	新規な定量的多型解析方法
【請求項の数】	21
【発明者】	
【住所又は居所】	茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院生命工学工 業技術研究所内
【氏名】	倉根 隆一郎
【発明者】	
【住所又は居所】	茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院生命工学工 業技術研究所内
【氏名】	金川 貴博
【発明者】	
【住所又は居所】	茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院生命工学工 業技術研究所内
【氏名】	鎌形 洋一
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都千代田区東神田1-9-8 環境エンジニアリン グ株式会社内
【氏名】	蔵田 信也
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都千代田区東神田1-9-8 環境エンジニアリン グ株式会社内
【氏名】	山田 一隆

【発明者】

【住所又は居所】 東京都千代田区東神田1-9-8 環境エンジニアリング株式会社内

【氏名】 横幕 豊一

【特許出願人】

【識別番号】 597031070

【氏名又は名称】 財団法人バイオインダストリー協会

【特許出願人】

【識別番号】 000001144

【氏名又は名称】 工業技術院長 梶村 皓二

【特許出願人】

【識別番号】 000156581

【氏名又は名称】 環境エンジニアリング株式会社

【指定代理人】

【識別番号】 220000404

【氏名又は名称】 工業技術院生命工学工業技術研究所長 大箸 信一

【代理関係の特記事項】 特許出願人 工業技術院長の指定代理人

【代理人】

【識別番号】 100077698

【弁理士】

【氏名又は名称】 吉田 勝広

【代理関係の特記事項】 特許出願人 環境エンジニアリング株式会社及び
特許出願人 財団法人バイオインダストリー協会の代理人

【復代理人】

【識別番号】 100077698

【弁理士】

【氏名又は名称】 吉田 勝広

【代理関係の特記事項】 特許出願人 工業技術院長の復代理人

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規な定量的多型解析方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 標的遺伝子を定量的遺伝子増幅方法で増幅し、その標的遺伝子について多型解析することにより標的遺伝子の量及び該遺伝子の多型の構成比もしくはその量の測定を行うことを特徴とする新規な定量的多型解析方法。

【請求項2】 多型解析方法がT-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism)、RFLP (restriction fragment length polymorphism) 方法、SCP (single strand conformation) 方法、またはCFLP (cleavase fragment length polymorphism) 方法である請求項1に記載の定量的多型解析方法。

【請求項3】 定量的遺伝子増幅方法が、定量的PCR方法である請求項1または2に記載の多型解析方法。

【請求項4】 定量的PCR方法が蛍光消光プローブを用いるものである請求項1～3の何れか1項に記載の定量的多型解析方法。

【請求項5】 蛍光消光プローブは、その末端において蛍光色素で標識されており、当該プローブが当該末端部において標的遺伝子にハイブリダイゼーションしたとき、当該プローブにハイブリダイゼーションした標的遺伝子の末端塩基対部分から1ないし3塩基離れて、標的遺伝子の塩基配列にG（グアニン）が少なくとも1塩基存在するように、当該プローブの塩基配列が設計され、当該プローブが標的標的遺伝子にハイブリダイゼーションしたときに、蛍光色素が、蛍光強度を減少させるものである請求項1～4の何れか1項に記載の定量的多型解析方法。

【請求項6】 蛍光消光プローブが3'末端において蛍光色素で標識されている請求項1～5の何れか1項に記載の定量的多型解析方法。

【請求項7】 蛍光消光プローブが5'末端において蛍光色素で標識されている請求項1～5の何れか1項に記載の定量的多型解析方法。

【請求項8】 蛍光消光プローブは、その末端において蛍光色素で標識されており、当該プローブが標的遺伝子にハイブリダイゼーションしたとき、当該末端に

において当該プローブと標的遺伝子とのハイブリッド複合体の塩基対が少なくとも G（グアニン）と C（シトシン）のペアーを形成するように、当該プローブの塩基配列が設計され、かつ当該プローブが標的遺伝子にハイブリダイゼーションしたときに、蛍光色素が、蛍光強度を減少させるものである請求項 1～5 の何れか 1 項に記載の定量的多型解析方法。

【請求項 9】 蛍光消光プローブが 3' 末端において蛍光色素で標識されている請求項 8 に記載の定量的多型解析方法。

【請求項 10】 蛍光消光プローブが 5' 末端において蛍光色素で標識されている請求項 8 に記載の定量的多型解析方法。

【請求項 11】 蛍光色素がリン酸基に標識された蛍光消光プローブである請求項 4～10 の何れか 1 項に記載の定量的多型解析方法。

【請求項 12】 定量的 PCR 方法において、蛍光消光プローブをプライマーとして用い、蛍光色素の発光の減少量を測定する請求項 7、10、または 11 に記載の定量的多型解析方法。

【請求項 13】 定量的 PCR 方法がリアルタイムモニタリング定量的 PCR 方法である請求項 4～12 の何れか 1 項に記載の定量的多型解析方法。

【請求項 14】 リアルタイムモニタリング定量的 PCR 方法で得られるデータを解析する方法において、標的遺伝子が消光プローブとハイブリダイズしたときの反応系の蛍光強度値を、前記のハイブリダイズしていないときの反応系の蛍光強度値により補正処理する演算処理過程を有することを特徴とするリアルタイムモニタリング定量的 PCR 方法のためのデータ解析方法。

【請求項 15】 請求項 14 に記載のリアルタイムモニタリング定量的 PCR 方法のためのデータ解析処理過程を有することを特徴とする請求項 1～13 の何れか一項に記載の定量的多型解析方法。

【請求項 16】 請求項 1～13 の何れか 1 項に記載の定量的 PCR 方法に使用する試薬キットにおいて、請求項 4～11 の何れか 1 項に記載の消光プローブを含有するか、もしくは添付されていることを特徴とする定量的 PCR 用試薬キット。

【請求項 17】 請求項 15 に記載の定量的 PCR 方法のための試薬キットを含

有するかもしれない添付されていることを特徴とする定量的多型解析用試薬キット。

【請求項 1 8】 請求項 1 4 に記載のデータ解析方法をコンピュータに実行させるためのプログラムを記録したことを特徴とするコンピュータ読み取り可能な P C R 方法のデータ解析のための記録媒体。

【請求項 1 9】 請求項 1 4 に記載のデータ解析方法を実施するための手段を有することを特徴とするリアルタイムモニタリング定量的 P C R 方法のためのデータ解析装置。

【請求項 2 0】 請求項 1 ～ 1 3 の何れか一項、もしくは請求項 1 5 に記載の多型解析方法で得られるデータを解析する方法をコンピュータに実行させるためのプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体において、請求項 1 4 に記載のデータ解析方法をコンピュータに実行させるためのプログラムを合わせ記録したことを特徴とするコンピュータ読み取り可能な定量的多型解析方法のデータ解析のための記録媒体。

【請求項 2 1】 請求項 1 9 に記載の P C R 方法のためのデータ解析装置を有することを特徴とする定量的多型解析方法のためのデータ解析装置。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は新規な定量的多型解析方法、当該方法に用いる遺伝子増幅方法、当該定量的遺伝子増幅方法によって得られるデータを解析する新規な解析方法、定量的 P C R 方法用試薬キット、定量的多型解析方法用試薬キット、定量的 P C R 方法によって得られるデータを解析する方法をコンピュータに実行させるためのプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な P C R 方法のデータ解析のための記録媒体、定量的多型解析方法で得られるデータを解析する方法をコンピュータに実行させるための手順のプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体、定量的 P C R 方法のための解析装置および定量的多型解析のための解析装置に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

PCR方法（蛋白質・核酸・酵素；35巻、17号、1990年、共立出版株式会社）で標的遺伝子を増幅し、それを多型解析する方法は、格段の技術的改良がなされて、現在、医学等の各分野で広く活用されている（実験医学、15巻、7号、1997年、羊土社）。そして、各種疾病、特に免疫に係る病気の遺伝子からの解明がなされ、成果が得られている。

【0003】

しかしながら、従来の多型解析方法においては、定量性をもたないPCRを用いてなされていたために、また配列の類似した遺伝子の中で一つの標的遺伝子のみを増幅させる（例えば、活性汚泥から抽出した全DNAから一つの特微生物種の16SrRNAの遺伝子（DNA）配列だけを増幅させる）ほど特異性がないために、標的遺伝子を増幅する前の初期の遺伝子の量や多型の構成比まで解析することが出来なかった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、前記の状況に鑑み、増幅前の標的遺伝子の量及び該遺伝子の多型の構成比の測定を簡便かつ迅速に行う新規な多型解析方法、当該方法に用いる新規な定量的PCR方法、当該定量的PCR方法に用いる蛍光消光プローブ、当該定量的PCR方法によって得られるデータを解析する新規な解析方法、定量的PCR方法用試薬キット、定量的多型解析方法用試薬キット、定量的PCR方法によって得られるデータを解析する方法をコンピュータに実行させるためのプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能なPCR方法のデータ解析のための記録媒体、定量的多型解析方法で得られるデータを解析する方法をコンピュータに実行させるための手順のプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体、定量的PCR方法のための解析装置および定量的多型解析のための解析装置を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、前記課題を解決するにあたり鋭意努力した結果、定量的遺伝子

増幅方法を用いて標的遺伝子を増幅したのち、その標的遺伝子について多型の解析を行うことにより、増幅前の標的遺伝子の量と該遺伝子の多型の構成比の測定が簡便、迅速かつ定量性よく行うことができるという知見を得た。本発明はかかる知見に基づいて完成されたものである。

【0006】

すなわち、本発明は、定量的遺伝子増幅方法、特に定量的PCR方法で標的遺伝子を増幅し、それらの遺伝子について多型解析を行うことにより増幅前の標的遺伝子の量の測定と当該遺伝子の多型の同定、存在量比、存在量の測定・解析を定量性よく行うことを特徴とする新規な定量的多型解析方法、当該方法に用いる新規な定量的PCR方法、当該定量的PCR方法に用いる蛍光消光プローブ、当該定量的PCR方法によって得られるデータを解析する新規な解析方法、定量的PCR方法用試薬キット、定量的多型解析方法用試薬キット、定量的PCR方法によって得られるデータを解析する方法をコンピュータに実行させるためのプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能なPCR方法のデータ解析のための記録媒体、定量的多型解析方法で得られるデータを解析する方法をコンピュータに実行させるための手順のプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体、定量的PCR方法のための解析装置および定量的多型解析のための解析装置を提供する。

【0007】

【発明の実施の形態】

次に好ましい実施の形態を挙げて本発明をさらに詳細に説明する。

先ず、本発明において使用する用語を以下のように定義する。

“標的遺伝子”とは、存在量の測定・定量若しくは定量的検出の対象である核酸または遺伝子のことをいう。当該遺伝子は、DNA、RNA、オリゴデオキシリボヌクレオチド、オリゴリボヌクレオチドからなっている。また当該遺伝子は、これらの各種遺伝子が混在していてもよく、また、タンパク質類、多糖類等の高分子化合物類、アミノ酸類、糖類、ヌクレオチド類、塩基類、ビタミン類、無機化合物類等の低分子化合物類が混在してもよい。また、細胞の中に存在していてもよい。すなわち、特別な制限はない。細胞は真核細胞、原核細胞を問わない。

。また、細胞は種々の細胞が混在していてもよい。精製の有無を問わない。また、濃度の大小も問わない。例えば、複合微生物系または共生微生物系における解析目的の特定遺伝子である。なお、精製が必要な場合は従来公知の方法で行うことができる。例えば市販されている精製キットなどを使用して行うことができる。

【 0 0 0 8 】

“PCR”とは、ポリメラーゼ・チン・リアクション (polymerase chain reaction) のことであり、現在、分子生物学、分子細胞学、遺伝子工学等などで常用されている反応である。

“定量的PCR方法”とは、PCR前の標的遺伝子の存在量を、PCRを行って測定もしくは検出する方法である。

“蛍光消光プローブ”とは、蛍光色素で標識された核酸プローブで標的遺伝子にハイブリダイズしたとき、蛍光強度が減少するように設計されたプローブである。

【 0 0 0 9 】

“PCRにおけるプライマー、核酸プローブおよびハイブリダイズ、ハイブリダイゼーション”とは、現在、分子生物学、遺伝子工学等で使用されている用語と同じ意味である。

【 0 0 1 0 】

“多型”とは、生物学的多型 (polymorphisms) のことであるが、本発明においては、特に、その多型をもたらしている遺伝子 (RNA、DNA、遺伝子) の多型である。現在分子生物学で使用されている意味と同じである。

“多型解析”とは、遺伝子にはどのような多型があるかを分析・解析することである。

【 0 0 1 1 】

現在、上記の多型解析方法には、SSOP (sequence specific oligonucleotide probe) 方法、RFLP (restriction fragment length polymorphism) 方法、T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) 方法、SSCP (single strand conformation) 方法、MPH方法、CFLP (cleavage fragment length polymorphism) 方法、

rphism) 方法、SSP (sequences specific primer) 方法、PHFA (preferential homoduplex formation assay) 方法、SBT (sequence based typing) 方法 (PCR 方法、利用の手引き、中外医学社、1998 年; 蛋白質・核酸・酵素; 35 巻、17 号、1990 年、共立出版株式会社; 実験医学、15 巻、7 号 (増刊号)、1997 年) などがあるが、本発明においては、現在多型解析に用いられている方法はすべて使用できるが、特に T-RFLP 方法、または CFLP 方法が好適に使用できる。

【0012】

以下、本発明を順を追って具体的に説明する。

本発明の第一の特徴は定量的遺伝子増幅方法である。定量的遺伝子増幅方法は、定量性を有する方法であればどの方法でも採用できる。例えば、PCR 方法が好適に採用できる。その中でも定量的 PCR 方法もしくはリアルタイムモニタリング定量的 PCR 方法がより好ましい方法である。それらの中でも、特に蛍光消光プローブを用いる本発明の新規なリアルタイムモニタリング定量的 PCR 方法が好適に採用できる。

従来公知の定量的 PCR 方法には、例えば、RT-PCR、RNA-primed PCR、Stretch PCR、逆 PCR、Alu 配列を利用した PCR、多重 PCR、混合プライマーを用いた PCR、PNA を用いた PCR 等の方法などを挙げることができる。

【0013】

これら従来公知の定量的 PCR 方法は、dATP、dGTP、dCTP および dTTP 若しくは dUTP、標的遺伝子 (DNA または RNA)、Taq ポリメラーゼ、プライマー、並びに蛍光色素で標識した核酸プローブ若しくはインターカレーターを用いて、Mg イオンの存在下に、温度を低温、高温を繰り返しつつ標的遺伝子を増幅し、増幅過程の蛍光色素の発光の増加量をリアルタイムでモニタリングするものである (実験医学、15 巻、7 号、46~51 ページ、1997 年、羊土社)。

【0014】

本発明の蛍光消光プローブを用いる定量的 PCR 方法は、蛍光色素で標識した

プローブを用いる方法であるが、当該プローブが標的遺伝子とハイブリしたときに蛍光発色が減少若しくは消光するように設計されたプローブを用いる定量的PCR方法である。

例えば、蛍光消光プローブは、その末端において蛍光色素で標識されており、当該プローブが当該末端部において標的遺伝子にハイブリダイゼーションしたとき、当該プローブにハイブリダイゼーションした標的遺伝子の末端塩基対部分から1ないし3塩基離れて、標的遺伝子の塩基配列にG（グアニン）が少なくとも1塩基存在するように、当該プローブの塩基配列が設計され、当該プローブが標的標的遺伝子にハイブリダイゼーションしたときに、蛍光色素が、蛍光強度を減少させるものが好適である。それらの中でも、蛍光消光プローブが3'末端または5'末端において蛍光色素で標識されているものがより好適である。

【0015】

また、蛍光消光プローブは、その末端において蛍光色素で標識されており、当該プローブが標的遺伝子にハイブリダイゼーションしたとき、当該末端において当該プローブと標的遺伝子のハイブリッド複合体の塩基対が少なくともG（グアニン）とC（シトシン）のペアー（GC塩基対）を形成するように、当該プローブの塩基配列が設計され、かつ当該プローブが標的遺伝子にハイブリダイゼーションしたときに、蛍光色素が、蛍光強度を減少させるものが好適である。それらの中でも、蛍光消光プローブが3'末端または5'末端において蛍光色素で標識されているものがより好適である。

【0016】

この場合、標的遺伝子の塩基配列からどうしても5'または3'末端がGまたはCに設計できない場合は、標的遺伝子の塩基配列から設計したプライマーであるオリゴヌクレオチドの5'末端に5'-グアニル酸または5'-シチジル酸を付加しても、本発明の目的は好適に達成できる。よって、本発明の蛍光消光プローブとは、標的遺伝子の塩基配列から設計したプローブの他に、当該プローブの3'または5'末端、好ましくは5'末端に5'-グアニル酸または5'-シチジル酸を付加してなるプローブを含むものと定義する。

【0017】

本発明において蛍光色素は、一般に核酸プローブに標識して、核酸の測定・検出に用いられるものが便利に使用できるが、蛍光色素で標識された核酸プローブが標的遺伝子にハイブリダイゼーションしたときに、プローブに標識した当該蛍光色素が、その発光を減少させるもの、すなわち消光するものが好適に用いられる。例えば、フルオレセイン (fluorescein) 又はその誘導体類 (例えば、フルオレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate) (FITC) 若しくはその誘導体等、Alexa 488、Alexa 532、cy3、cy5、EDANS (5-(2'-aminoethyl)amino-1-naphthalene sulfonic acid)、ローダミン (rhodamine) 6G (R6G) 又はその誘導体 (例えば、テトラメチルローダミン (tetramethylrhodamine) (TMR)、テトラメチルローダミンイソチオシアネート (tetramethylrhodamine isothiocyanate) (TMRITC)、x-ローダミン (x-rhodamine)、テキサスレッド (Texas red)、ボデピー (BODIPY) FL (商標名; モレキュラー・プローブ (Molecular Probes) 社製、米国)、ボデピー (BODIPY) FL/C3 (商標名; モレキュラー・プローブ (Molecular Probes) 社製、米国)、ボデピー (BODIPY) FL/C6 (商標名; モレキュラー・プローブ (Molecular Probes) 社製、米国)、ボデピー (BODIPY) 5-FAM (商標名; モレキュラー・プローブ (Molecular Probes) 社製、米国)、ボデピー (BODIPY) TMR (商標名; モレキュラー・プローブ (Molecular Probes) 社製、米国)、又はその誘導体 (例えば、ボデピー (BODIPY) TR (商標名; モレキュラー・プローブ (Molecular Probes) 社製、米国)、ボデピー (BODIPY) R6G (商標名; モレキュラー・プローブ (Molecular Probes) 社製、米国)、ボデピー (BODIPY) 564 (商標名; モレキュラー・プローブ (Molecular Probes) 社製、米国)、ボデピー (BODIPY) 581 (商標名; モレキュラー・プローブ (Molecular Probes) 社製、米国) 等を挙げることができる。これらの中でも、FITC、EDANS、6-joe、TMR、Alexa 488、Alexa 532、ボデピー (BODIPY) FL/C3 (商標名; モレキュラー・プローブ (Molecular Probes) 社製、米国)、ボデピー (BODIPY) FL/C6 (商標名; モレキュラー・プローブ (Molecular Probes) 社製、米国) 等を好適なものとして、また、FITC、TMR、6-jeo、ボデピー (BODIPY) FL/C3 (商標名; モレキュラー・プローブ (Molecular Probes) 社製、米国)、ボデピー (BODIPY) FL/C6 (商標名; モレキュラー・プローブ (Molecular Probes) 社製、米国) 社

製、米国) をより好適なものとして挙げることができる。

【 0 0 1 8 】

本発明において用いる蛍光色素で標識したプライマーは、オリゴデオキシリボヌクレオチドまたはオリゴリボヌクレオチドで構成されており、その塩基数は5～50であり、好ましくは10～25、特に好ましくは15～20である。そして、標的遺伝子に特異的にハイブリダイズする塩基配列のものであればよい。

【 0 0 1 9 】

本発明の蛍光色素で標識した蛍光消光プローブのオリゴヌクレオチドは、通常の一般的オリゴヌクレオチド製造方法で製造できる。化学合成法、またプラスミドベクター若しくはファージベクターなどを使用する微生物法などで調製できる (Tetrahedron letters、22巻、1859～1862ページ、1981年 ; Nucleic acids Research、14巻、6227～6245ページ、1986年) 。なお、現在、市販されている核酸合成機を使用するのが好適である (例えば、ABI 394 (Perkin Elmer社製)) 。

蛍光消光プローブを定量的PCR方法のプライマーとして使用する場合は、その調製において、フォワード (forward) 型、リバース (reverse) 型もしくはバックワード (backward) 型のどちらに設計してもよい。

【 0 0 2 0 】

オリゴヌクレオチドに蛍光色素を標識するには、従来公知の標識法で行なうことができる (Nature Biotechnology、14巻、303～308ページ、1996年 ; Applied and Environmental Microbiology、63巻、1143～1147ページ、1997年 ; Nucleic acids Research、24巻、4532～4535頁、1996年) 。例えば、5' 末端に蛍光色素分子を結合させる場合は、先ず、常法に従って5' 末端を脱リンし、リボースの5' 位炭素のOH基にスペーサーもしくはリンカーとして $-(CH_2)_n-SH$ 、 $-(CH_2)_n-NH_2$ などを導入する。また、リボースの5' または3' 位のリン酸基にこれらのスペーサーもしくはリンカーを導入してもよい。それらのスペーサーもしくはリンカーに本発明の色素を結合させる。

【 0 0 2 1 】

これらの導入体は市販されているので市販品を購入してもよい (メドランド・

サーティファイド・レージント・カンパニー (Midland Certified Reagent Company))。この場合、 n は3～12、好ましくは6～10である。このスペーサーもしくはリンカーのマーカプト基またはアミノ基に反応性を有する蛍光色素またはその誘導体を結合させることにより合成できる。このようにして合成される、蛍光色素で標識されたオリゴヌクレオチドは逆相などのクロマトグラフィーなどで精製して本発明の蛍光消光プローブとすることができる。

【0022】

前記した本発明の蛍光消光プローブを使用する定量的PCR方法により、短時間、簡便かつ特異的に標的遺伝子を増幅することができる。そして、蛍光色素で5'末端が標識されている蛍光消光プローブを用いた場合は、蛍光色素で5'末端が標識された標的遺伝子が増幅されることになる。この場合、定量的PCR方法を採用するが好適である(実験医学、15巻、7号、1997年、羊土社)

【0023】

使用する機器であるサーマルサイクラーは、現在市販されている各種の機器が便利に用いることができる。それは、リアルタイムモニタリングが可能かどうかを問わない。リアルタイムモニタリング可能な機器として、例えば、ABI PRISMTM 7700 Sequence Detection System (SDS 7700) (Perkin Elmer Applied Biosystems社、USA)、LightCyclerTM Sytem (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社、ドイツ)等を特に好適なものとして挙げるることができる。

【0024】

遺伝子増幅は、従来公知の増幅反応条件で達成できる。増幅は一般に通常用いられている増幅度まで行うのがよい。標的遺伝子の増幅過程において、蛍光強度値を蛍光光度計で測定する。その変化量は増幅された遺伝子量に比例する。蛍光強度値の変化量を時間(PCR方法の場合はサイクル数)の関数として、通常のグラフにプロットするとS字型(シグモイド)曲線になり、辺対数グラフにプロットすると、最初は指数関数と同様に直線状に増加し、その後穏やかなプラトーに達する曲線になる。

PCR開始前の初期遺伝子量の定量性を向上させるための標的遺伝子の増幅の程度すなわち遺伝子増幅の反応を停止する時期は、多型系解析の目的に依存する

ので、特に限定されるものではない。すなわち、多型系の優先多型だけを解析する場合には、前記蛍光変化が観察され始めてから前記のプラトーに達する前までの任意の時間まで標的遺伝子を増幅させるのが好適である。最も好適には指数関数的増幅期（シグモイド曲線の中点（曲線の微分値が0になる点）に達する前）で反応を止めることである。しかし、多型系に含まれる多型全部を解析する場合、試行錯誤的に何回かの実験を行い、最良と考えられる増幅度を求め、反応系における多型を示す遺伝子全てが観察され得る程度まで増幅するのがよい。また増幅を複数回に分けて、すなわち複数の増幅度で実験を行い、総合的に結果を解析する方法も好適に採用される。それは、マイナーな多型は時間的に大きなラグ（遅延）を有するシグモイド曲線を描くようになるからである。

【 0 0 2 5 】

本発明の蛍光消光プローブをプライマーとして用いて、定量的PCR方法、特にリアルタイムモニタリング定量的PCR方法を行った場合は、プライマーとしての蛍光消光プローブが標的遺伝子が増幅に次から次へと利用され、蛍光色素で5'末端が標識された標的遺伝子が増幅される。そして、増幅された標的遺伝子はお互いに対応する標的遺伝子とハイブリダイズする。ハイブリダイズすると、蛍光強度値が減少する。それで、蛍光強度の減少量をトレースすることにより前記と同様にして最良な増幅度まで増幅反応を行えばよい。当該定量的PCR方法も通常のPCR方法と同様の反応条件で反応を行うことができる。それで、Mgイオン濃度が低濃度（1～2 mM）もしくは従来公知の高濃度（2～4 mM）である反応系で標的遺伝子が増幅を行うことができる。

【 0 0 2 6 】

前記の標的遺伝子が増幅反応前に、標準の遺伝子を用いて遺伝子の検量線を作成しておくのが好ましい。例えば、前記の本発明の蛍光消光プローブをプライマーとして用い、前記リアルタイムモニタリング定量的PCR方法を行った場合について記述する。

そして、蛍光強度の減少量をサイクル数の関数として、通常のグラフにプロットするとS字型（シグモイド）曲線になる。そして、減少速度の最も大きい時点のサイクル数と標的遺伝子量の初期のコピー数（PCR開始前のコピー数）、す

なわち初期の標的遺伝子とは指数関数的な関係にある。それらの時点のサイクル数とコピー数の関係の標準直線を作成しておけば、未知試料の標的遺伝子の最初のコピー数、すなわち最初の標的遺伝子量を求めることができる。

なお、前記の蛍光消光プローブを用いる定量的PCR方法は、本発明者らによって開発された新規な方法である。

【0027】

本発明の第二の特徴は、当該定量的PCR方法によって得られるデータを解析する新規な解析方法である。本発明の解析方法は、初期の標的遺伝子量をできるだけ正確に測定するには現在最も好適なものである。

【0028】

まず、データ解析方法について説明する。

当該方法は3つの特徴からなる。

第一の特徴は、各サイクルにおける増幅した遺伝子が蛍光色素と結合したとき、あるいは増幅した遺伝子が蛍光消光プローブとハイブリダイズした、すなわちハイブリッド複合体を形成したときの反応系（例えば、アニーリン反応終了時の反応系、核酸伸長反応進行時またはその終了時の反応系）の蛍光強度値を、各サイクルにおける前記の結合したもの、あるいは前記のハイブリッド複合体が解離したときの反応系（例えば、変性反応終了時の反応系、アニーリング反応開始前の反応系）の蛍光強度値により補正する演算処理過程、すなわち、補正演算処理過程である。

【0029】

補正演算処理過程の補正演算処理としては本発明の目的に合致するものであればどのようなものでもよいのであるが、具体的には、次の【数式1】あるいは【数式2】による処理過程を含むものを例示することができる。

【数1】

$$f_n = f_{\text{hyb},n} / f_{\text{den},n} \quad \dots \text{【数式1】}$$

【数2】

$$f_n = f_{\text{den},n} / f_{\text{hyb},n} \quad \dots \text{【数式2】}$$

〔式中、

f_n : [数式 1] あるいは [数式 2] により算出された n サイクルにおける補正演算処理値、

$f_{hyb,n}$: n サイクルにおける、増幅した遺伝子が蛍光色素と結合したとき、あるいは増幅した遺伝子がハイブリッド複合体を形成したときの反応系の蛍光強度値、

$f_{den,n}$: n サイクルにおける、前記の結合したもの、あるいはハイブリッド複合体が解離したときの反応系の蛍光強度値] 。

なお、本過程においては、本過程で得られた補正演算処理値もしくは当該値を各サイクル数に対してグラフ上にプロットし、コンピュータのディスプレイ上に表示および／または印字する過程を含むものである。

【 0 0 3 0 】

第二の特徴は、各サイクルにおける [数式 1] あるいは [数式 2] による補正演算処理値を次の [数式 3] あるいは [数式 4] に代入し、各サンプル間の蛍光変化割合すなわち蛍光消光率を算出し、それらを比較するデータ解析過程である。

【 0 0 3 1 】

【数 3】

$$F_n = f_n / f_a \quad \dots \text{[数式 3]}$$

【数 4】

$$F_n = f_a / f_n \quad \dots \text{[数式 4]}$$

[式中、

F_n : n サイクルにおける、[数式 3] あるいは [数式 4] により算出された蛍光変化割合すなわち蛍光消光率、

f_n : [数式 1] あるいは [数式 2] による補正演算処理値

f_a : [数式 1] あるいは [数式 2] による補正演算処理値で、 f_n の変化が観察される以前の任意のサイクル数のものであるが、通常は例えば、10～40 サイクルのもの、好適には 15～30 サイクルのもの、より好適には 20～30 サイクルのものが採用される。]

なお、本過程においては、本過程で得られた算出値、比較値もしくは当該値を

各サイクル数に対してグラフ上にプロットし、コンピュータのディスプレイ上に表示および／または印字する過程を含むものであるが、〔数式 1〕あるいは〔数式 2〕による補正演算処理値については、それらの過程は含むものであっても、含まないものであってもよい。

【0032】

第三の特徴は、i) 〔数式 3〕あるいは〔数式 4〕により算出された蛍光変化割合すなわち蛍光消光率のデーターを用いて、〔数式 5〕、〔数式 6〕あるいは〔数式 7〕による演算処理する過程、

【数 5】

$$\log_b (F_n), \ln (F_n) \quad \dots \text{〔数式 5〕}$$

【数 6】

$$\log_b \{(1 - F_n) \times A\}, \ln \{(1 - F_n) \times b\} \quad \dots \text{〔数式 6〕}$$

【数 7】

$$\log_b \{(F_n - 1) \times A\}, \ln \{(F_n - 1) \times A\} \quad \dots \text{〔数式 7〕}$$

【0033】

〔式中、

A, b : 任意の数値、好ましくは整数値、より好ましくは自然数である。そして、 $A = 100$ 、 $b = 10$ のときは、 $\{(F_n - 1) \times A\}$ は百分率(%)を表す。

F_n : 〔数式 3〕あるいは〔数式 4〕により算出された n サイクルにおける蛍光変化割合すなわち蛍光消光率〕、

【0034】

ii) 前記 i) の演算処理値が一定値に達したサイクル数を求める演算処理過程、

iii) 既知濃度の核酸試料におけるサイクル数と反応開始時の標的遺伝子のコピー数の関係式を計算する演算処理過程、

iv) 未知試料における PCR 開始時の標的遺伝子のコピー数を求める演算処理過程、

を有するデータ解析方法である。そして、i) → ii) → iii) → iv) の順からなる過程が好適である。

【0035】

前記 i) ～ iv) の各過程においては、各過程で得られた演算処理値もしくは当該値を各サイクル数に対してグラフ上にプロットし、コンピュータのディスプレイ上に表示および／または印字する過程を含むものであってもよい。

なお、[数式 1] あるいは [数式 2] による補正演算処理値、[数式 3] あるいは [数式 4] による算出処理値は、各サイクル数に対してグラフ上にプロットし、コンピュータのディスプレイ上に表示および／または印字されても、されなくてもよいので、それらの過程は必要に応じて追加すればよい。

【 0 0 3 6 】

また、本発明は、前記の定量的 PCR 方法に用いる試薬キット、前記のデータ解析方法をコンピュータに実行させるためのプログラムを記録したことを特徴とするコンピュータ読み取り可能な記録媒体である。

また、本発明は、前記のデータ解析方法を実施するための手段を有することを特徴とするデータ解析装置である。

【 0 0 3 7 】

本発明の第三の特徴は、前記のようにして本発明の定量的 PCR 方法で増幅された遺伝子について、多型を解析する方法である。

そこで、多型解析方法について具体的に説明する。多型解析の各種方法の中でも T-RFLP 方法が本発明において好適に利用できる。そこで、本発明の一つの例として、蛍光消光プローブをプライマーとして用いる定量的 PCR 方法、特にリアルタイムモニタリング定量的 PCR 方法で、遺伝子を増幅し、かつ PCR 前の初期遺伝子量を測定する。そして、その増幅産物について、T-RFLP 方法で多型を解析する方法について記述する。なお、蛍光消光プローブをプライマーとして用いて増幅された遺伝子は 5' 末端が本発明の蛍光色素で標識されている。

(1) 先ず、増幅産物を制限酵素で消化する。このとき制限酵素としては、現在公知のどのようなものでも用いられるが、例えば、Bso FI、Hha I、Hph I、Mn I I、Rca I、Alu I、Msp I などを挙げることができる。これらの中でも好ましいものとしては、Hha I、Alu I、Msp I など、最も好ましいものとしては、Hha I である。消化反応条件は現在公知の遺伝子についての通常の方法でよい。例えば、制限酵素として Hha I を選んだ場合、10 単位の制限酵素濃度にて、37℃、6 時

間反応させる。

【0038】

(2) 前記ようにして消化された遺伝子断片について、加熱変性して、一本鎖化することが好適である。この変性処理も公知の通常のことで行うことができる。例えば、97℃、5分処理後、水中にて冷却する。

【0039】

(3) 遺伝子断片の分析・解析

本発明の多型解析方法では、蛍光色素で標識された遺伝子断片だけを、電気泳動方法、HPLC方法、シーケンサー方法などで分析し、解析することになる。

すなわち、蛍光強度値で各バンド、各ピークを検出する。検出は現在市販されている通常の分析機器を使って行うことができる。例えば、ABI 373A (ABI社のシーケンサー)、ABI377 (ABI社のシーケンサー)、Biofocus 3000 (バイオラット社)などを挙げることができる。

【0040】

本発明において、前記分析で、複数のバンド、または複数のピークが出現することは多型が存在することになる。シングルバンドまたはシングルピークの場合は多型が存在しないことになる。各バンドまたは各ピークの蛍光強度値の比は、とりもなおさず多型の存在比になる。前記の本発明の定量的PCR方法ではPCRを行う前の標的遺伝子の量が測定されるので、この測定値に前記の多型の比を乗ずれば、多型の初期存在量が求められることになる。

多型に関して、このようにしてデータを出す方法は、本発明の蛍光消光プローブを用いる定量的PCR方法を使用することにより初めて可能になるものである。

また、前記の定量的PCR方法のための試薬キットを含有するかもしくは添付させることにより、便利な定量的多型解析用試薬キットになる。

また、前記の多型解析方法で得られるデータを解析する方法をコンピュータに実行させるためのプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体において、前記のリアルタイムモニタリング定量的PCRのデータ解析方法をコンピュータに実行させるためのプログラムを合わせ記録することにより、コンピュ

タ読み取り可能な定量的多型解析方法のデータ解析のためのより便利な記録媒体になる。

また、量的多型解析方法のための手段を有する多型解析装置において、PCR方法のためのデータ解析装置を併設させることにより、便利な多型解析装置になる。

【0041】

【実施例】

次に実施例をもって、本発明をさらに具体的に説明する。しかし、本実施例をもって本発明は限定されるものではない。

実施例1

蛍光消光現象を有する本発明の蛍光消光プローブの標的遺伝子の塩基選択性、即ち、塩基特異性を検討した。下記に示す標的遺伝子（デオキシリボオリゴヌクレオチド）（30mer）のpoly a～jの10種類をDNA合成機ABI 394(Perkin Elmer社製、米国）で調製した。

【0042】

更に、上記の標的遺伝子に対応するデオキシリボオリゴヌクレオチドの5'末端にボデピーFLで標識した下記に示す本発明の蛍光消光プローブを調製した。

当該デオキシリボオリゴヌクレオチドの5'末端のリン酸基に、 $-(CH_2)_6-NH_2$ を結合したものをメドランド・サーティファイド・レージント・カンパニー社（Midland Certified Reagent Company、米国）から購入した。更に、モレキュラープローブ（Molecular Probes）社からフロオ・リポーターキット（FluoReporter Kits）F-6082（ボデピーFLのプロピオン酸サクシニジルエステル（BODIPY FL propionic acid succinidyl esters）の他に、当該化合物をオリゴヌクレオチドのアミン誘導体に結合させる試薬を含有するキット）を購入した。当該キットを前記購入の前記デオキシリボオリゴヌクレオチドに作用させて下記のボデピーFLで標識した本発明の蛍光消光プローブprobe a～d、及びf～hを合成した。そして対応する標的遺伝子とハイブリダイゼーションしたときに、蛍光強度がどの程度減少するか（すなわち、消光の程度）を下記の条件下に調べ、本発明のプローブの特異性を検討した。

【0043】

なお、前記合成物の精製は以下のように行った。

合成物を乾固し乾固物を得た。それを0.5M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 緩衝液 (pH 9.0) に溶解した。当該溶解物をNAP-25カラム (ファルマシア社製) でゲルろ過を行い、未反応物を除去した。さらに逆相HPLC (B gradient: 15~65%、25分間) を以下の条件で行った。そして、溶出するメインピークを分取した。分取した画分を凍結乾燥して、最初のオリゴヌクレオチド原料2mMより目的物を50%の収率で得た。

【0044】

逆相クロマトグラフィーの条件:

溶出溶剤A: 0.05N TEAA 5% CH_3CN

溶出溶剤B (グラジエント (gradient) 用): 0.05N TEAA 40% CH_3CN

カラム: CAPCELL PAK C18; 6×250mm

溶出速度: 1.0ml/min

温度: 40℃

検出: 254nm

【0045】

名称	標的遺伝子
poly a	5' ATATATATTTTTTTTGTTTTTTTTTTTT3'
poly b	5' ATATATATTTTTTTTGTTTTTTTTTTTT3'
poly c	5' ATATATATTTTTTTTGTTTTTTTTTTTT3'
poly d	5' ATATATATTTTTTTTGTTTTTTTTTTTT3'
poly e	5' ATATATATTTTTTTTGTTTTTTTTTTTT3'

【0046】

名称	標的遺伝子
poly f	5' ATATATATTTTTTTTCTTTTTTTTTTTT3'
poly g	5' ATATATATTTTTTTTCTTTTTTTTTTTT3'
poly h	5' ATATATATTTTTTTTCTTTTTTTTTTTT3'
poly i	5' ATATATATTTTTTTTCTTTTTTTTTTTT3'

poly j 5' ATATATATTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTT3'

【 0 0 4 7 】

名称 本発明の蛍光消光プローブ

probe a 3' TATATATAAAAAAAAAACAA5' -BODIPY FL/C6

probe b 3' TATATATAAAAAAAAAACA5' -BODIPY FL/C6

probe c 3' TATATATAAAAAAAAAAAC5' -BODIPY FL/C6

probe d 3' TATATATAAAAAAAAAAA5' -BODIPY FL/C6

【 0 0 4 8 】

名称 本発明の蛍光消光プローブ

probe f 3' TATATATAAAAAAAAAAGAA5' -BODIPY FL/C6

probe g 3' TATATATAAAAAAAAAAGA5' -BODIPY FL/C6

probe h 3' TATATATAAAAAAAAAAG5' -BODIPY FL/C6

【 0 0 4 9 】

(1) ハイブリダイゼーション溶液のコンポーネント

合成DNA	3 2 0 n M (終濃度)
核酸プローブ	8 0 n M (終濃度)
N a C l	5 0 m M (終濃度)
M g C l ₂	1 m M (終濃度)
トリスー塩酸緩衝液 (p H = 7 . 2)	1 0 0 m M (終濃度)
ミリQ純水	1 . 6 9 9 2 m l
終全量	2 . 0 0 0 0 m l

(2) ハイブリダイゼーションの温度 : 5 1 ℃

(3) 測定条件 :

励起光 : 5 4 3 n m

測定蛍光色 : 5 6 9 n m

【 0 0 5 0 】

【表 1】

表 1		
蛍光消光プローブ	標的遺伝子	蛍光強度の減少 (%)
a	a	-10
b	b	2
c	c	75
d	d	48
d	e	18
f	f	-8
g	g	-2
h	h	70
d	i	-6
d	j	-5

【0 0 5 1】

その結果を表 1 に示した。表 1 から分かるように、蛍光色素で標識された蛍光消光プローブが標的遺伝子にハイブリダイゼーションしたときに、当該末端部において、当該プローブと標的遺伝子とがハイブリダイゼーションした末端塩基対部分において GC ペアを形成しているか、または末端塩基対部分から 1 ～ 3 塩基離れて、標的遺伝子の塩基配列に G（グアニン）が少なくとも 1 塩基以上存在するように、当該プローブの塩基配列が設計されていることが好適であることを示している。

【0 0 5 2】

実施例 2

下記のような塩基配列の標的遺伝子（デオキシリボオリゴヌクレオチド）と本発明の蛍光消光プローブを調製した。標的遺伝子内の G 及び本発明の核酸プローブ内の G の数の影響について、前記実施例と同様にして調べ、その結果を表 2 にまとめた。

【0 0 5 3】

名称	標的遺伝子
----	-------

poly k 5' TATATATATATTTTTGGGGG3'
 poly l 5' TATATATATATTTTTGGGGG3'
 poly m 5' TATATATATTTTTTTTTGGGG3'
 poly n 5' TATATATATTTTTTTTTGG3'
 poly o 5' TATATATATTTTTTTTTTG3'

【 0 0 5 4 】

名称 標的遺伝子
 poly p 5' TATATATATATTTTTCCCCC3'
 poly q 5' TATATATATATTTTTCCCCC3'
 poly r 5' TATATATATTTTTTTTTCCC3'
 poly s 5' TATATATATTTTTTTTTCC3'
 poly t 5' TATATATATTTTTTTTTTC3'
 poly u 5' TATATATATTTTTTTTTTT3'

【 0 0 5 5 】

名称 蛍光消光プローブ
 probe k 3' ATATATATATAAAAAACCCC5' -BODIPY FL/C6
 probe l 3' ATATATATATAAAAAACCCC5' -BODIPY FL/C6
 probe m 3' ATATATATATAAAAAACCC5' -BODIPY FL/C6
 probe n 3' ATATATATATAAAAAAAC5' -BODIPY FL/C6
 probe o 3' ATATATATATAAAAAAAC5' -BODIPY FL/C6

【 0 0 5 6 】

名称 蛍光消光プローブ
 probe p 3' ATATATATATAAAAAAGGGG5' -BODIPY FL/C6
 probe q 3' ATATATATATAAAAAAGGG5' -BODIPY FL/C6
 probe r 3' ATATATATATAAAAAAGGG5' -BODIPY FL/C6
 probe s 3' ATATATATATAAAAAAGG5' -BODIPY FL/C6
 probe t 3' ATATATATATAAAAAAG5' -BODIPY FL/C6
 probe u 3' ATATATATATAAAAAA5' -BODIPY FL/C6

【 0 0 5 7 】

【表 2】

表 2

蛍光消光プローブ	標的遺伝子	蛍光強度の減少 (%)
k	k	93
l	l	92
m	m	94
n	n	92
o	o	87
p	p	61
q	q	68
r	r	69
s	s	75
t	t	73
u	u	2

【0 0 5 8】

表 2 から分かるように、蛍光消光プローブが標的遺伝子にハイブリダイゼーションしたときに、当該末端部においてハイブリダイゼーション物の塩基対が G と C のペアを少なくとも一対以上形成するように、当該プローブの塩基配列が設計されていることが好適であることが分かる。

【0 0 5 9】

実施例 3

下記のような塩基配列の標的遺伝子と蛍光消光プローブを調製した。標的遺伝子内の塩基種および蛍光消光プローブ内の塩基種の影響について、前記実施例と同様にして調べ、その結果を表 3 にまとめた。

【0 0 6 0】

名称	標的遺伝子
poly W	5' CCCCCCTTTTTTTTTTTT 3'
poly X	5' GGGGGGAAAAAAAAAAAA 3'
poly Y	5' TTTTTTCCCCCCCCCCCC 3'
poly Z	5' AAAAAAGGGGGGGGGGGG 3'

【 0 0 6 1 】

名称	蛍光消光プローブ
probe w	BODIPY FL/C6-5' AAAAAAAAAAGGGGGG 3'
probe x	BODIPY FL/C6-5' TTTTTTTTCCCCCC 3'
probe y	BODIPY FL/C6-5' GGGGGGGGAAAAAA 3'
probe z	BODIPY FL/C6-5' CCCCCCCCCTTTTTT 3'

【 0 0 6 2 】

【表 3】

表 3

蛍光消光 プローブ	標的遺伝子	プローブのみの 蛍光強度 (A)	標的遺伝子 添加後の 蛍光強度 (B)	蛍光強度の減少 (%) (C)
w	w	330	380	-15
x	x	440	430	2
y	y	40	50	25
z	z	360	30	92

なお、蛍光強度の減少 (%) は、 $C = \{ (A - B) / A \} \times 100$ により計算した。

表 3 から、本発明の蛍光消光プローブの蛍光強度の減少に G が深く関与していることが分かる。

【 0 0 6 3 】

結果として、前記の実施例から、(A) 蛍光色素で標識される蛍光消光プローブの末端が C で構成され、標的遺伝子がハイブリダイゼーションしたとき、G C ペアを形成する場合、(B) 蛍光色素で標識される蛍光消光プローブの末端が C 以外の塩基で構成されているとき、蛍光色素で標識されている個所の塩基と、標的遺伝子の塩基との末端塩基ペアより、標的遺伝子の 3' 末端側に G が少なくとも 1 個以上存在する場合に、蛍光強度の減少率が大きいことが分かる。

【 0 0 6 4 】

実施例 4

本発明の蛍光消光プローブに標識する色素の種類について、前記実施例と同様にして調べた。なお、当該プローブは、前記実施例 3 の蛍光消光プローブ z を、また、標的遺伝子は前記実施例 3 の標的遺伝子 z を用いた。

その結果を、表 4 に示した。表から分かるように、本発明に用いる蛍光色素として好適なものは、FITC、BODIPY FL、BODIPY FL/C3、6-joe、TMRなどを挙げることができる。

【 0 0 6 5 】

【表 4】

表 4	
蛍光色素	蛍光強度の減少 (%)
FITC	9 0
BODIPY FL	9 5
BODIPY FL/C3	9 8
6-joe	7 5
TMR	9 3

なお、蛍光強度の減少 (%) は、前記実施例 7 と同様に計算した。

【 0 0 6 6 】

実施例 5

蛍光色素BODIPY FLで修飾した蛍光消光プローブEu47FおよびEu1392Rの調製

(5 - 1) 蛍光消光プローブEu47Fの合成

(5 ') C I T A A C A C A T G C A A G T C G (3 ') (I = i n o s i n e) の塩基配列をもつデオキシリボオリゴヌクレオチドの 5 ' 末端のリン酸基に、実施例 1 と同じようにしてボデビー FL で標識した蛍光消光プローブ Eu 47 F を合成した。

【 0 0 6 7 】

(5 - 2) 蛍光消光プローブEu1392Rの合成

(5 ') T T G T A C A C A C C G C C C G T C A (3 ') の塩基配列をもつデオキシリボオリゴヌクレオチドを用いて、前記 (5 - 1) と同様にして、本発明の蛍光消光プローブ Eu 1392

Rの合成した。

【0068】

実施例 6

(6-1) 大腸菌JM109株の培養

53培地(組成:カゼインペプトン(カゼインのトリプシン消化物)、10g;酵母エキス、5g;グルコース、5g;食塩、5g;蒸留水、1000mL)用いて大腸菌JM109株を培養した(培地50mL/250mL容コニカルフラスコ、37℃、12時間、振とう培養)。そして、培養液から菌体を集めた(遠心分離10,000rpm、5分、蒸留水で2回洗浄)。

【0069】

(6-2) 16SrRNAのcDNAの調製

菌体から、SOGENキット(ニッポンジーン社)を用いて全RNAを本キットのプロトコルに従って抽出した。

その後、BcaBESTTM RNA PCRキット(宝酒造株式会社)を用い、本キットのプロトコルに従って、前記抽出液について、16sRNAを対象とした増幅と逆転写反応(RT-PCR)を公知の通常の条件で行った。その際、前記の本発明の蛍光消光プローブEu1392Rをプライマーとして用いた。続いて、RNAをRnase Hにより分解し(30℃、20分)、16SrRNA遺伝子の純粋なcDNAを得た。cDNA濃度をOliGreen^R ssDNA Quantitationキット(Molecular Probes)を使用して測定した。

【0070】

実施例 7

(7-1) 定量的PCR、データ解析およびcDNAの検量線の作成

前記cDNA溶液について、本発明の蛍光消光プローブEu47FおよびEu1392Rをプライマーとして用い、リアルタイムモニタリング定量的PCR反応を行った。なお、前者はフォワード(forward)型のプライマーとし、後者をリバース(reverseまたはbackward)型のプライマーとした。

リアルタイムモニタリング定量的PCR装置として、LightCyclerTM Sytem(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社、ドイツ)を使用し、手順書記載の手順に従って反応を行った。なお、DNAポリメラーゼとしてTaKaRaTaqTM(宝酒

造株式会社)を使用した。

【0071】

PCRは次のコンポーネントで行った。

大腸菌 cDNA	1. 0 μ l (最終濃度 $10^2 \sim 10^6$ コピー)
プライマー溶液	4. 0 μ l (最終濃度 0. 1 μ M)
<u>TaKaRaTaqTM</u>	10. 0 (μ l 0. 5 Units)
ミリQ純水	5. 0 μ l
全容量	20. 0 μ l

なお、cDNAは、図1の注に示される実験区のコピー数で実験を行った。MgCl₂の最終濃度は2 mMであった。

【0072】

反応条件は次の如くであった。

変性 (denaturation) 反応初期:	95℃、60秒
再:	96℃、10秒
アニーリング (annealing) 反応:	50℃、5秒
DNA伸長反応:	72℃、60秒

測定条件は次の如くであった。

励起光	:	543 nm
測定蛍光色	:	569 nm

【0073】

前記の条件でリアルタイムモニタリング定量的PCRを行って、各サイクルの蛍光強度を実測した。その実測値を本発明のデータ解析方法に従って解析した。すなわち、次の過程でデータを処理した。

(a) 各サイクルにおける増幅した核酸が蛍光色素で標識された核酸プライマーとハイブリダイズしたときの反応系の蛍光強度値(すなわち核酸伸長反応終了時(72℃)の蛍光強度値)を、増幅した核酸が核酸プライマーとハイブリダイズしたものが完全に解離したときの反応系の蛍光強度値(すなわち核酸熱変性反応終了時(96℃)の蛍光強度値)で割る補正演算処理過程、すなわち、実測の蛍光強度値を[数式1]で補正した。

【数 8】

$$f_n = f_{\text{hyb},n} / f_{\text{den},n} \quad \dots \text{【数式 1】}$$

〔式中、 f_n = サイクルの蛍光強度の補正值、 $f_{\text{hyb},n}$ = 各サイクルの 7 2℃ の蛍光強度値、 $f_{\text{den},n}$ = 各サイクルの 9 6℃ の蛍光強度値〕

【0 0 7 4】

(b) 各サイクルにおける〔数式 1〕における補正演算処理値を〔数式 3〕に代入し、各サイクルにおける各サンプル間の蛍光消光率を算出する演算処理過程、すなわち、下記の〔数式 1 0〕で演算処理する過程、

【数 9】

$$F_n = f_n / f_{25} \quad \dots \text{【数式 1 0】}$$

〔式中、 F_n = 各サイクルの演算処理値、 f_n = 〔数式 1〕で得られた各サイクルの値、 $f =$ 〔数式 1〕で得られた値で、サイクル数が 2 5 回目のもの〕。

〔数式 1 0〕は〔数式 3〕において、 $a = 2 5$ とした場合におけるものである。

。

【0 0 7 5】

(c) 前記 (b) の過程で得られた各サイクルの演算処理値を〔数式 6〕による蛍光強度の変化率（減少率または消光率）の対数値を演算処理をする過程、すなわち、下記の〔数式 1 1〕で演算処理する過程、

【数 1 0】

$$\log_{10} \{ (1 - F_n) \times 100 \} \quad \dots \text{【数式 1 1】}$$

〔式中、 F_n = 〔数式 1 0〕で得られた値〕。

〔数式 1 1〕は〔数式 6〕において、 $b = 1 0$ 、 $A = 1 0 0$ とした場合におけるものである。

【0 0 7 6】

上記の結果を図 1 に示した。

図 1 は、前記 (a)、(b)、(c) の過程で計算された値を、サイクル数に対してプロットし、印字したものである。

【0 0 7 7】

次に、図 1 のグラフを基に、次の (d) および (e) の過程で処理した。

(d) 前記 (c) の過程で処理されたデーターの内、0.2 をスレッシュホールド (threshold) し、その値に達したサイクル数を計算する過程。

(e) 前記 (d) の過程で計算した値を X 軸に、反応開始前のコピー数を Y 軸にプロットしたグラフ、すなわち大腸菌 cDNA の検量線 (図 2) を作成する過程。

図 2 は、本発明の定量的 PCR 方法で得られるデータを、本発明のデータ解析方法、すなわち、(a)、(b)、(c)、(d)、(e) の過程で処理した最終結果である。図 2 から未知コピー数の核酸試料について反応開始前のコピー数を精度よく求めることができることが分かる。

【0078】

実施例 8

(8-1) 多型系 (複合微生物系) の構築

(表 5 に示した 10 種類の細菌菌株を DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) から購入し、前記の 53 培地を用いて各々の菌株について別個に培養した。培養条件は前記大腸菌の場合と同様である。各々の培養液から菌体を集めた (遠心分離 10,000 rpm、10 分、蒸留水で 2 回洗浄)。各々の菌体について、前記と同様にして SOGEN キット (ニッポンジェーン社) を用いて全 RNA を抽出した。

【 0 0 7 9 】

表 5

菌株No.	DSMZ No.	HhaI断片 (bp)	T-RFLP から求めた モル構成率 (%)	定量コピー数	定量コピー数/ 初期添加コピー数
1	65	22	9.5	27400	0.91
2	3138T	43	10.9	31400	1.05
3	12778	52	9.7	27900	0.93
4	20530	104	9.4	27100	0.90
5	50108	168	10.4	30000	1.00
6	20152	332	9.3	26800	0.89
7	43879	404	9.7	27900	0.93
8	20579	432	9.9	28500	0.95
9	5078	531	10.4	30000	1.00
10	43673	626	10.8	31100	1.04

【 0 0 8 0 】

- 1 : *Paracoccus pantotrophus*
- 2 : *Sphingomonas natatoria*
- 3 : *Bdellovibrio stolpii*
- 4 : *Microbacterium imperiale*
- 5 : *Pseudomonas fluorescens*
- 6 : *Agromyces medislanum*
- 7 : *Cellulomonas cellulans*
- 8 : *Brevibacterium liquefaciens*
- 9 : *Leminella grimontii*
- 10 : *Rhodococcus luteus*

【 0 0 8 1 】

その後、前記の大腸菌の場合と同様にして、それぞれの菌株の16SrRNA遺伝子の純粋なcDNAを得た。得られた10菌株各々のcDNA濃度を前記の大腸菌の場合と同様にして測定した。cDNA濃度の判明した溶液について、蒸留水にて300,000 copy/ μ Lとなるように希釈した。10菌株分について、希釈液を当量ずつ混合したものを複合微生物系すなわち多型系（以下、多型系という。）とした。この多型系には、10菌株分のcDNAがそれぞれ300,000 copy/ μ Lの濃度で含まれているので、全体として、3,000,000 copy/ μ Lの濃度cDNAが含有していることになる。

【0082】

（8-2）リアルタイムモニタリング定量的PCR

前記多型系のcDNAについて、本発明の蛍光消光プローブEu47FおよびEu1392Rを菌株共通のプライマーとして用いて、前記大腸菌と同様にしてリアルタイムモニタリング定量的PCRを行った。

多型系のサンプルを、絶対量で300,000 copy/20 μ L（反応液全体20 μ L）となるように反応液に添加した。多型系のリアルタイムモニタリング定量的PCRは、蛍光強度の減少が観察され、かつ遺伝子の指数関数的増幅期である22サイクル数で反応を停止させた（図1参照）。スレッシュホールドを、 $\log R_n$ （蛍光消光率）=0.2と設定したときの、多型系について行ったリアルタイムモニタリング定量的PCRの反応液のcDNAのコピー数は288,000コピーであった（図2参照）。初期添加量すなわち理論値は300,000コピーであるから、本発明の方法によって作成された検量線は良好な定量性を示すことが確認された。

【0083】

実施例9

多型解析

（9-1）T-RFLPによる解析

前記のようにしてPCR反応を行った後、増幅産物をカラム（MicroconPCR、Millipore Corporation Bedford, MA, USA）を用いて精製した。精製物を制限酵素Hha1（認識部位：GCG/C、/＝切断個所）で0/N（一晚）処理した。処理終了後

、切断断片のみをカラム (Micro c n 及び Micropure-EZ、Millipore Corporation Bedford, MA, USA) で精製した。制限酵素処理後の各菌株の c D N A 断片の大きさは、表 5 に示した。

カラム精製を施した cDNA 溶液について、加熱変性処理を行った後、シーケンサー (ABI PRISM 310、PE Applied Biosystems) にて T-RFLP 解析を行った。そのピークパターンを図 3 に示した。各ピークを濃度が既知である標準 BODIPY FL 修飾断片を用いて定量した。各ピークのモル構成率を求めた結果、すべてのモル構成率は、9.4 ~ 10.8 の範囲に収まっており、PCR 増幅効率の極端な差異認められなかった (表 5 参照)。定量的 PCR で求めた全 c D N A のコピー数にモル構成率を掛け、それぞれの菌株の初期の cDNA のコピー数を求めた (表 5 参照)。定量により求めたコピー数 / 初期添加コピーは 0.89 ~ 1.04 (表 5 参照) であった。よって、本方法により多型系における多型の初期コピーを正確に定量できることが判明した。

【 0 0 8 4 】

【発明の効果】

本発明の定量的多型解析方法は、上記のような構成であるために次のような効果を有する。

1) 標的遺伝子の量及び該遺伝子の多型の構成比の測定を簡便、迅速かつ定量性よく行うことができる。

2) 本発明の定量的 PCR 方法の一つは新規なものであり、かつ定量性が優れたものである。

3) 定量的 PCR 方法で得られたデータを解析する解析方法の一つも新規な方法であり、PCR 反応前の初期の遺伝子のコピー数を正確に求めることができる。

4) 本発明の新規な定量的 PCR 方法においては、増幅核酸は蛍光色素で標識されている。それで、多型の解析では蛍光色素をマーカとして分析できる。

5) 2) ~ 4) の結果、特に定量性の優れた多型解析方法になる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明の定量的 PCR 方法を用いた 16 S r R N A 遺伝子 (c D N A

) の増幅曲線

実線：大腸菌の c D N A ; 点線：多型系の c D N A

10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 ：コピー数を表示する。

【図 2】 本発明のデータ解析方法によって作成された c D N A の検量線

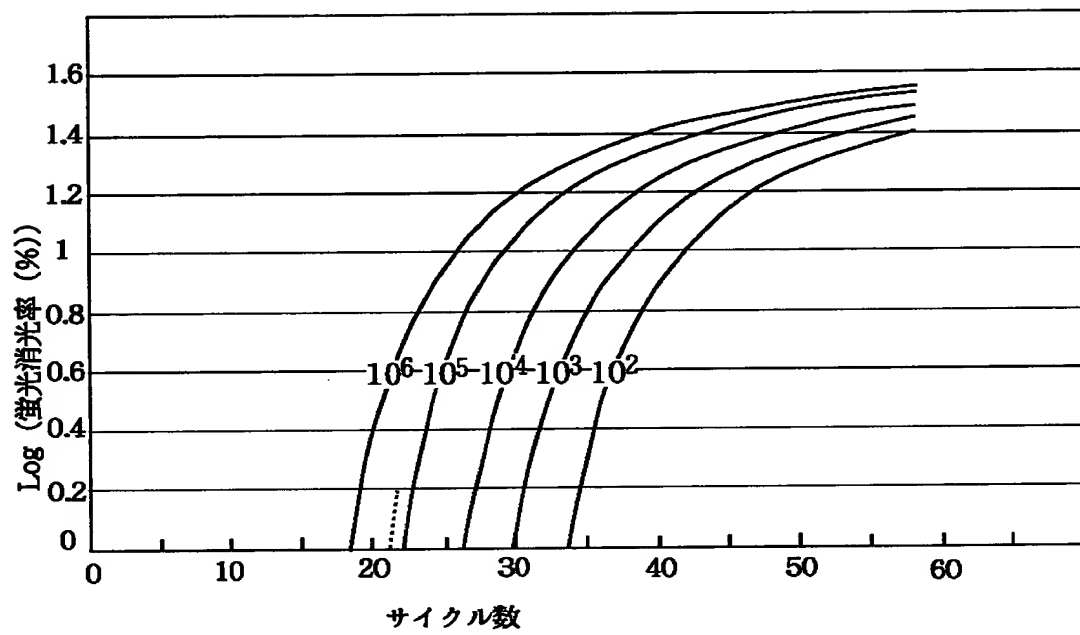
a : 2 8 8 0 0 0 コピー

【図 3】 本発明の多型系の T-RFLP の解析パターン

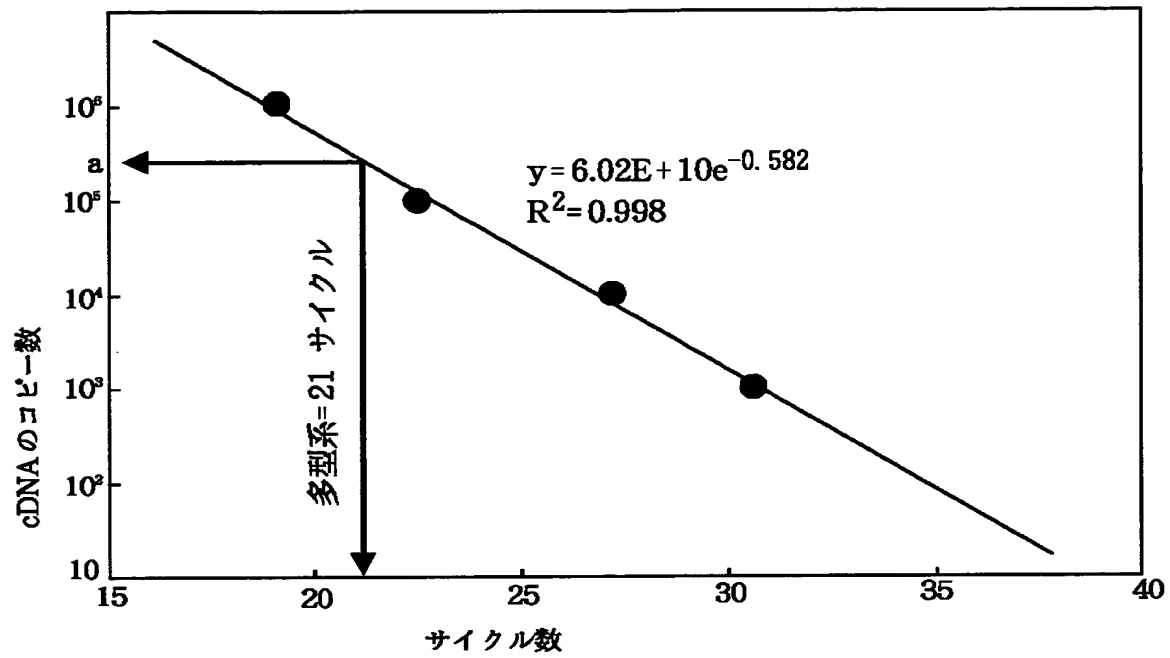
b p : 塩基数 (base pair)

【書類名】 図面

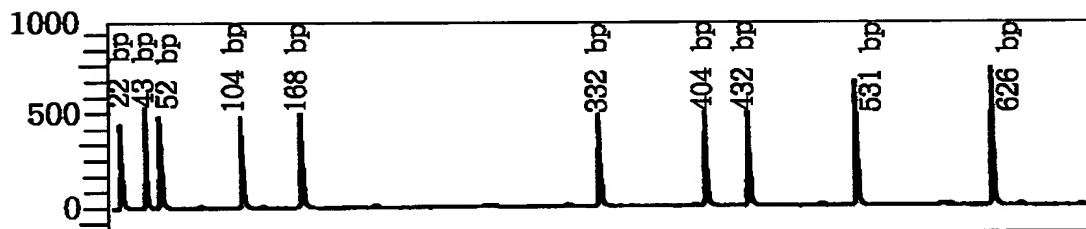
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 定量性の優れた多型の解析方法を提供する。

【解決手段】 消光プローブを用いた新規な定量的PCR方法によって標的遺伝子を増幅し、該増幅産物について多型解析することを特徴とする方法を提供する。PCR開始前の遺伝子のコピー数は、本発明のデータ解析方法により正確に求めることができる。すなわち、定量的PCR方法で得られるデータを解析する際、核酸伸長反応時の蛍光強度値を、熱変性反応終了時の蛍光強度値を用いて補正する演算処理過程を有することを特徴とするデータ解析方法を用いて求めることができる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 0 - 1 9 3 1 3 3
受付番号	5 0 0 0 0 8 0 5 8 1 2
書類名	特許願
担当官	東海 明美 7 0 6 9
作成日	平成 1 2 年 1 1 月 7 日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	597031070
【住所又は居所】	東京都中央区八丁堀 2 - 2 6 - 9
【氏名又は名称】	財団法人 バイオインダストリー協会

【特許出願人】

【識別番号】	000001144
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関 1 丁目 3 番 1 号
【氏名又は名称】	工業技術院長

【特許出願人】

【識別番号】	000156581
【住所又は居所】	東京都千代田区東神田一丁目 9 番 8 号
【氏名又は名称】	環境エンジニアリング株式会社

【指定代理人】

【識別番号】	220000404
【住所又は居所】	茨城県つくば市東 1 - 1 - 3
【氏名又は名称】	工業技術院生命工学工業技術研究所長

【代理人】

【識別番号】	100077698
【住所又は居所】	東京都千代田区神田佐久間町三丁目 3 0 番地 ア コスビル 2 0 1 号室 吉田特許事務所
【氏名又は名称】	吉田 勝広

【復代理人】

【識別番号】	100077698
【住所又は居所】	東京都千代田区神田佐久間町三丁目 3 0 番地 ア コスビル 2 0 1 号室 吉田特許事務所
【氏名又は名称】	吉田 勝広

【書類名】 出願人名義変更届（一般承継）

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2000-193133

【承継人】

【識別番号】 301000011

【住所又は居所】 東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1

【氏名又は名称】 経済産業省産業技術総合研究所長 日下 一正

【連絡先】 部署名 経済産業省産業技術総合研究所

筑波研究支援総合事務所特許管理課

担当者 楠本 眞 電話番号 0298-6
1-2179

【提出物件の目録】

【物件名】 権利の承継を証明する書面 1

【援用の表示】 平成3年特許願第28561号

【プルーフの要否】 要

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 0 - 1 9 3 1 3 3
受付番号	5 0 1 0 0 0 3 8 3 4 6
書類名	出願人名義変更届（一般承継）
担当官	東海 明美 7 0 6 9
作成日	平成 1 3 年 2 月 9 日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成13年 1月12日
【承継人】	申請人
【識別番号】	301000011
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関1丁目3番1号
【氏名又は名称】	経済産業省産業技術総合研究所長

【書類名】 出願人名義変更届（一般承継）

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2000-193133

【承継人】

【識別番号】 301021533

【住所又は居所】 東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1

【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

【代表者】 吉川弘之

【連絡先】 部署名 独立行政法人産業技術総合研究所
知的財産部知的財産管理室
担当者 楠本 眞
電話番号 0 2 9 8 - 6 1 - 3 2 8 1

【プルーフの要否】 要

認 定 ・ 付 加 情 報

特許出願の番号	特願 2 0 0 0 - 1 9 3 1 3 3
受付番号	5 0 1 0 0 7 8 2 0 0 3
書類名	出願人名義変更届（一般承継）
担当官	佐々木 吉正 2 4 2 4
作成日	平成 1 3 年 1 0 月 5 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成13年 5月30日
-------	-------------

【書類名】 出願人名義変更届

【提出日】 平成13年 6月 6日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

 【出願番号】 特願2000-193133

【承継人】

 【識別番号】 000156581

 【氏名又は名称】 環境エンジニアリング株式会社

【承継人代理人】

 【識別番号】 100077698

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 吉田 勝広

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 010135

 【納付金額】 4,200円

【その他】 譲渡証書及び共有者の同意書は、本日付け提出の手續補
足書により提出した。

【提出物件の目録】

 【包括委任状番号】 9717259

【プルーフの要否】 要

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 9 7 0 3 1 0 7 0]

1. 変更年月日 1 9 9 7 年 3 月 5 日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都中央区八丁堀 2 - 2 6 - 9
氏 名 財団法人 バイオインダストリー協会

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001144]

1. 変更年月日	1990年 9月20日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区霞が関1丁目3番1号
氏 名	工業技術院長

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000156581]

1. 変更年月日	1996年 8月27日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都千代田区東神田一丁目9番8号
氏 名	環境エンジニアリング株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [3 0 1 0 0 0 0 1 1]

1. 変更年月日	2 0 0 1 年 1 月 4 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区霞が関 1 丁目 3 番 1 号
氏 名	経済産業省産業技術総合研究所長

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [301021533]

1. 変更年月日	2001年 4月 2日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区霞が関1-3-1
氏 名	独立行政法人産業技術総合研究所